

PCBs에 오염된 연안해양 Microcosm에서의 PCBs분해 유전자조작 *Pseudomonas putida* AC30(pMFB2)의 동태해석

민만기, 川端善一郎¹, 高田諫吉², 古川謙介³

서라벌대학 환경시스템공학과, ¹京都大學 生態學研究센터,
²愛媛大學 農學部 生物資源利用學, ³九州大學 農學部 農藝化學科

요 약

PCBs를 분해하는 *bphABC*유전자를 plasmid vector pMFB2에 유전자조작한 *Pseudomonas putida* AC30(pMFB2)를 PCBs에 오염된 연안해역의 해수와 저니로 만든 microcosm에 도입한 결과, 각각 도입 4일과 7일만에 사멸하였다. 그러나, 도입한 *P. putida* AC30(pMFB2)는 사멸하였지만, 연안해수와 저니 microcosm에서 plasmid pMFB2가 전이한 토착미생물이 검출되었다. 도입한 *P. putida* AC30(pMFB2)의 생산실패의 원인을 분석한 결과 공경 0.2 μ m의 filter를 통과하는 물질과 생물이 가장 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 유전자조작 *P. putida* AC30(pMFB2)의 도입과 *bphABC*유전자의 토착미생물로의 전이에 따른 토착미생물군집에 미치는 영향을 개체수 변동으로 조사한 결과, 토착미생물 군집에 미치는 영향은 보이지 않았다. *P. putida* AC30(pMFB2)의 도입에 의한 PCBs의 생분해성을 분석하였다. 그러나, 도입한 유전자조작 균주가 생산에 실패함으로써 잔류하고 있는 PCBs의 농도변화는 보이지 않았다.

서 론

자연환경은 다양·다량의 인공합성 유기화합물에 오염되어 있으며, 이들중에는 독성 또는 위해한 물질로 변환될 위험이 있다⁽¹⁾. 어느 환경중에 그들 환경오염물질이 미량으로 존재하더라도, 그들은 생태계의 식물연쇄를 통해 생물농축되어 공중보건상의 영향도 염려되고 있다⁽²⁾. 따라서, 현재 이들의 제거를 위하여 미생물의 생분해능을 이용하는 생물학적인 처리방법(bioremediation)에 관심이 집중되고 있으며, 환경오염물질 분해유전자를 조작하는 biotechnology기술의 발달은 난분해성 유기화합물의 분해율을 향상시키는 강력한 수단이 되고 있다⁽³⁾.

1966년 처음으로 polychlorinated biphenyls(PCBs)가 환경중에서 잔류한다고 보고된 이래⁽⁴⁾, 편재성과 잔류성의 특성을 가진 이 환경오염물질은 커다란 환경문제로 대두되었다. 그러나, 이 환경오염물질이 지극히 난분해성임에도 불구하고, Ahmed & Focht⁽⁵⁾가 2종의 *Achromobacter* sp.에 의해 PCBs가 분해된다고 보고하였고, 그후 미생물균주에 의한 PCBs의 생분해에 대해 중점적으로 연구가 진행되었다.

biphenyl을 유일한 탄소원과 에너지원으로 이용하는 토양세균인 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707⁽⁶⁾의 PCBs분해 *bph* operon은 가장 널리 알려진 PCBs 분해유

전자로, 그 구성과 기구, 분자적인 특성, 생화학적·유전학적인 연구가 집중적으로 수행되어져 왔다^(7,8,9). 그러나, 이와같은 많은 연구성과를 가져왔음에도 불구하고, 환경중에서의 PCBs 분해세균의 생산성과 생태계영향에 관한 정보는 그다지 알려져있지 않다.

따라서, 본 연구에서는 *P. pseudoalcaligenes* KF707유래의 biphenyl/PCBs분해 *bph* operon을 유전자조작한 plasmid pMFB2를 benzoate 분해세균인 *P. putida* AC30에 도입하여 만든 *P. putida* AC30(pMFB2)를 유전자조작 세균으로, PCBs에 오염되어 있는 연안해역으로부터 채취한 해수 및 저니로 만든 연안해수·연안해저 microcosm에 도입하여, 그들의 생산성과 *bph* operon의 토착세균으로의 전이, PCBs의 생분해성 및 개체수 변동으로 본 토착미생물군집으로의 영향에 대해 규명하였다.

결 과

P. putida AC30(pMFB2)의 생산성⁽¹⁰⁾

P. putida AC30(pMFB2)를 2.4×10^4 cell/ml의 밀도로 PCBs에 오염된 연안해역의 해수와 저니 microcosm에 도입하였다. 그 결과, 양쪽 microcosm에 있어서 *P. putida* AC30(pMFB2)는 도입초기부터 급격히 밀도가 감소하여 배양 10일 이내에 사멸하였다 (Fig. 1).

토착세균으로의 pMFB2의 전이⁽¹²⁾

도입한 *P. putida* AC30(pMFB2)가 급격히 감소한 시기에 PCBs 분해성 *bphABC* 유전자가 조작된 plasmid pMFB2가 전이된 토착세균이 발견되었다. 해수 microcosm에서는 pMFB2가 전이한 토착세균이 그후 사멸하였으나, 저니 microcosm에서는 배양 15일째에는 10^2 cells/ml의 저밀도로 생산하였다 (Fig. 2).

P. putida AC30(pMFB2)의 생산실패의 원인⁽¹¹⁾

연안해수와 연안저니 microcosm에 있어서 도입한 *P. putida* AC30(pMFB2)의 생산실패의 원인을 규명하기 위한 실험을 하였다. 그 결과, 해수의 염분농도가 토양토착세균인 *P. putida* AC30(pMFB2)에 미치는 영향은 보이지 않았으며, 연안해역의 해수와 저니중에 잔류하는 기질은 *P. putida* AC30(pMFB2)가 증식하기에 충분한 농도였다. 그러나, 공경 $0.2\mu\text{m}$ 의 filter로 여과한 여과액중에서는 *P. putida* AC30(pMFB2)가 급격히 감소하여, 공경 $0.2\mu\text{m}$ 의 filter를 통과하는 독성물질이나 생물이 *P. putida* AC30(pMFB2)의 생산실패의 원인이라고 생각되었다.

P. putida AC30(pMFB2)의 도입에 의한 토착미생물군집에 미치는 영향⁽¹⁰⁾

토착미생물군집을 virioplankton($0.015 \sim 0.2\mu\text{m}$), bacterioplankton($0.2 \sim 2.0\mu\text{m}$), zooplankton($2.0 \sim 20\mu\text{m}$, $20 \sim 200\mu\text{m}$) 및 phytoplankton($0.2 \sim 2.0\mu\text{m}$, $2.0 \sim 20\mu\text{m}$)으로 나누어

형광현미경법으로, 생균수를 viable count법으로, *P. putida* AC30(pMFB2)의 도입에 의한 토착미생물군집에 미치는 영향을 개체수 변화에 의해 평가하였다. 그 결과, *P. putida* AC30(pMFB2)의 도입에 따른 토착미생물군집의 개체수변화는 보이지 않았다(Fig. 3)

***P. putida* AC30(pMFB2)의 도입에 의한 PCBs 생분해**

채취한 연안저니중의 PCBs농도는 약 69ppb였다. 연안저니 microcosm에 도입한 *P. putida* AC30(pMFB2)와 pMFB2가 전이한 토착세균에 의한 PCBs 분해능을 GC-MS를 사용하여 측정하였다. 그러나, 잔류하고 있는 PCBs의 농도변화는 나타나지 않았다(Table 1).

***P. putida* AC30(pMFB2)의 생장성과 PCBs 농도와의 관계**

유기용매로 세정하여 잔류하고 있는 PCBs를 세정하고, 무균처리한 연안저니 microcosm에 *P. putida* AC30(pMFB2)의 개체수 밀도를 증식기질을 사용하여 약 10^8 , 10^9 , 10^{10} 로 조정하고, PCBs mixture(Kaneclor 300:400:500:600 = 1:1:1:1)를 60, 600ppb, 6, 60ppm으로 농도구배를 만들어 첨가하여, *P. putida* AC30(pMFB2)의 개체수 밀도와 PCBs농도에 따른 생분해능을 규명하기 위한 실험을 하였다(Fig. 4). 그 결과, *P. putida* AC30(pMFB2)의 개체군 밀도와 PCBs 농도구배에 따른 생분해의 상관관계는 보이지 않았다 (Table 2).

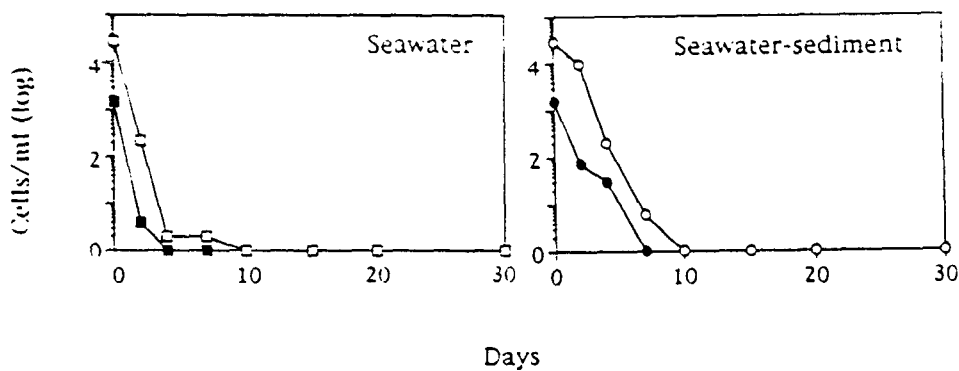


Fig. 1. Survival of *P. putida* AC30(pMFB2) in the seawater microcosm (■), and seawater-sediment microcosm (●), and host cells *P. putida* AC30 without plasmid pMFB2, together with AC30(pMFB2) in the seawater microcosm (□) and seawater-sediment microcosm (○).

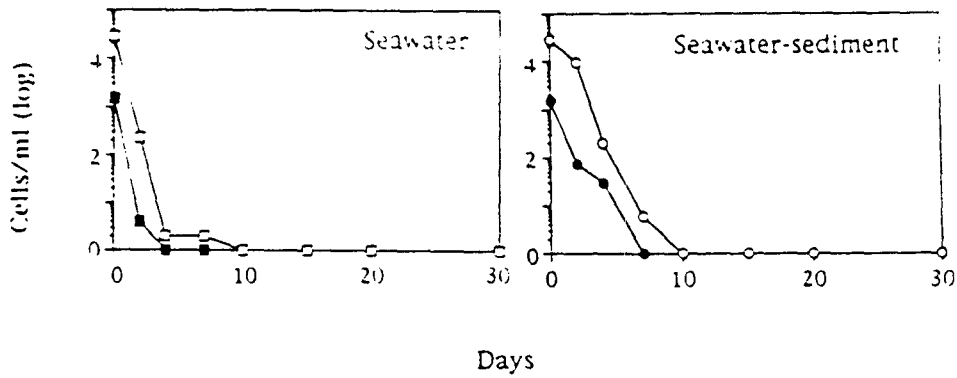


Fig. 2. Changes in densities of introduced *P. putida* AC30(pMFB2) (□, ○) and PCBs degrading indigenous bacteria (□, ○), transformed indigenous bacteria (■, ●) which were transferred with *bphABC* genes in the seawater microcosm and seawater-sediment microcosm. Dotted lines indicate the minimum levels of detection.

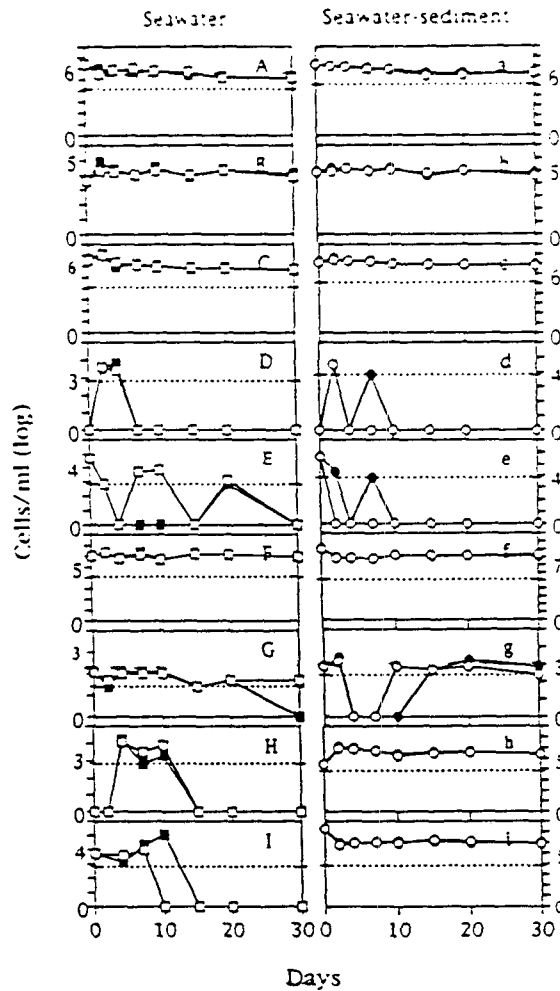


Fig. 3. Changes in densities of indigenous microorganisms in the seawater microcosm (■) and seawater-sediment microcosm (●) with inoculation of AC30(pMFB2), and seawater microcosm (□) and seawater-sediment microcosm (○) without inoculation of *P. putida* AC30(pMFB2). Symbols: Capital letters and small letters indicate seawater microcosm and seawater-sediment microcosm, respectively. A, a: virus. B, b: viable bacteria. C, c: total bacteria. D, d: pico-phytoplankton bearing chlorophyll a. E, e: pico-phytoplankton bearing chlorophyll a and phycobilin. F, f: micro-phytoplankton bearing chlorophyll a. G, g: micro-phytoplankton bearing chlorophyll a and phycobilin. H, h: micro-phytoplankton bearing chlorophyll a. I, i: micro-phytoplankton bearing chlorophyll a and phycobilin. Dotted lines indicate minimum levels of detection.

Table 1. Changes in concentration of PCBs after a 30 days-incubation in the seawater-sediment microcoms with and without *P. putida* AC30(pMFB2)

Substituted chlorine No.	PCBs concentration (ng/g in sediment ; ppb)		
	Before culture	After culture without AC30(pMFB2)	After culture with AC30(pMFB2)
2	2.8	2.6	2.2
3	15	16	14
4	27	26	25
5	5.5	6.8	5.2
6	5.5	7.5	7.5
7	4.9	5.9	5.5
8	1.3	1.2	1.1
9	0.14	0.17	0.14
Total PCBs concentration (ng/g in soil ; ppb)	69	76	70

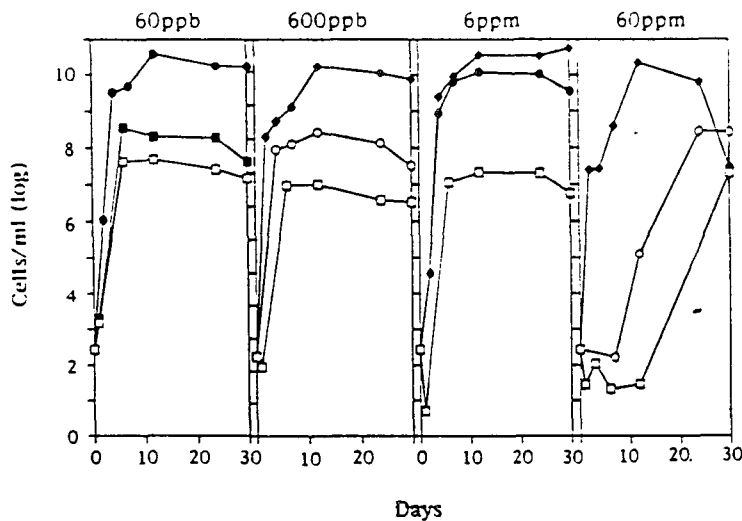


Fig. 4. Changes in densities of *P. putida* AC30(pMFB2) in the PAT culture medium with both PCBs mixture and nutrient (□; 0%, ■; 0.01%, ○; 0.1%, ●; 1%, ◆; 100%)

Table 2. Changes in concentration of PCBs after a 30 day-incubation of *P. putida* AC30(pMFB2) in the PAT culture medium with 60ppm of PCBs mixture.

PCBs isomer	Before culture	Average density of AC30(pMFB2)			
		0	1×10^7	$1 \times 10^{8-9}$	1×10^{10}
PCBs concentration (μ g/g of sediment; ppm)					
2	1.8	1.1	1.0	0.9	0.8
3	10	8.3	7.5	6.8	6.8
4	13	11	11	9.8	11
5	11	9.1	9.3	8.3	9.0
6	12	10	11	9.2	10
7	8.3	7.4	7.5	6.8	7.2
8	2.0	1.8	1.8	1.7	1.7
9	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Total PCBs concentration (μg/g of sediment ; ppm)	59	49	49	44	47

참 고 문 헌

1. Alexander. M. (1981) Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*. 211, 132-138.
2. Huisman, M., S. E. J. Enrenstein, C. Koopman-Esseboom, M. Brouwer, V. Fidler, F. A. J. Musliet, P. J. J. Sauer, and E. R. Boersma. (1995) Perinatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins through dietary intake. *Chemosphere*. 31, 4273-4287.
3. Erickson, B. D., and F. J. mondello. (1993) Enhanced biodegradatoion of polychlorinated biphenyls after site-directed mutagenesis of a biphenyl dioxygenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3858-3862.
4. Jensen, S. (1966) Report of anew chemical hazard. *New Sci.* 32, 612.
5. Ahmed, M. R., and D. D. Focht. (1973) Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Acromobacter*. *Can. J. Microbiol.* 19, 47-52.
6. Furukawa, K., and T. Miyazaki. (1986) Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* 166, 392-398.
7. Furukawa, K., N. Hayase, and K. Taira. (1990) Biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolic gene (*bph* operon) : organization, function, and morecular relationships in various pseudomans, p. 111-120. In A. M. Chacrabarty, B. Iglewski, S. Silver(eds.), *Pseudomonas : biotransformation, pathogenesis, and evolving biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
8. Furukawa, K., S. Hayashida, and K. Taira. (1992) Biochemical and genetic basis for the degradation of polychlorinated biphenyls in soil bacteria. In : Galli, E., S. Silver, and B. Witholt (eds.). *Pseudomonas : Moreculer biology and biotechnology* (p. 259-267), American Society for Microbiology, Washington, D. C.
9. Taira, K., J. Hirose, S. Hayashida, and K. Furukawa. (1992) Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Bio. Chem.* 267, 4844-4853.
10. Min, M.-G., Z. Kawabata, N. Ishii, R. Takata, and K. Furukawa, (1998) Fate of a PCBs-degrading recombinant *Pseudomonas putida* AC30(pMFB2) and its ecological effect in marine microco₂ contaminated with PCBs. *Intern. J. Environmental Studies*. 55, 271-285.
11. Kawabata, Z., M.-G. Min. N. Ishii, R. Takata, and K. Furukawa. (1998) Factors affecting the survival of *Pseudomonas putida* bearing PCBs-degrading recombinant plasmid in marine microcosms cotaminated with PCBs. *Intern. J. Environmental Studies*. 54, 223-232.
12. Min, M.-G., Z. Kawabata, N. Ishii, R. Takata, and K. Furukawa. (2000) Transfer of *bphABC* genes pf PCBs degrading recombinant *Pseudomonas putida* AC30(pMFB2) in marine microcosm s contaminated with PCBs. *J. Mar. Biotech.* (submitted).